

На правах рукописи



Мамаева Анна Станиславовна

**Регуляция оксидом азота клеточного цикла в культуре
Arabidopsis thaliana in vitro в зависимости от
функционирования пути передачи этиленового сигнала**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва, 2015

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Новикова Галина Викторовна

Официальные оппоненты:

Дейнеко Елена Викторовна

доктор биологических наук, профессор,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», заведующая лабораторией биоинженерии растений, г. Новосибирск

Савченко Татьяна Викторовна

доктор биологических наук, доцент,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории фотоокисления воды, г. Пущино

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов

Защита состоится «24» декабря 2015 г. в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.2110.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499)977-80-18; e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук www.ippras.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Оксид азота (NO) – многофункциональный регулятор физиологических процессов, происходящих на всех этапах жизненного цикла растений. Наблюдаемый в последнее время рост интереса к изучению NO у растений, в первую очередь, связан с его ролью как сигнальной молекулы. Принято считать, что в результате проведения первичного сигнала наряду с классическими вторичными посредниками (катионы кальция, производные инозита) образуется NO и его производные, которые способны передавать информацию об изменениях уровня внутриклеточных регуляторов и чувствительности к ним клеток.

Регуляция NO клеточного цикла является общебиологической проблемой как в связи с морфогенезом, так и адаптацией к действию стрессоров различной природы. В клетках животных функции NO в качестве регулятора клеточного цикла изучены достаточно подробно. Установлено, что «мишенями» NO в клетках животных могут быть G1/S- и/или G2/M-переходы (Kumar *et al.*, 2010; Napoli *et al.*, 2013). Изучение регуляции клеточного цикла у растений является непростой задачей. В норме деление клеток у растений происходит в локализованных меристемах. Однако необходимо регулировать дедифференцировку клеток при поранении, а также «запускать» эндоциклы, являющиеся характерной особенностью дифференцирующихся клеток растений.

Основными регуляторами клеточного цикла у растений являются фитогормоны, контролирующие прохождение разных его фаз (Dudits *et al.*, 2011). Среди фитогормонов в качестве регулятора клеточного цикла наименее изучен газообразный этилен, который часто называют «стрессовым» гормоном, хотя не вызывает сомнений его роль и в отсутствие стресса. На основании экспериментальных данных, имеющихся в настоящее время, едва ли возможно интегрировать эффекты NO с каноническим путём передачи этиленового сигнала, функционирующим в культивируемых клетках *A. thaliana*, которые не испытывают действия стрессоров.

Одна из самых актуальных задач современной физиологии растений – исследование проблемы взаимодействия (cross-talk) между разными фитогормонами и регуляторами роста. Имеется в виду не химическое взаимодействие этих веществ, а взаимное влияние на синтез, транспорт, деградацию и/или взаимодействие на уровне

компонентов путей передачи сигналов. В связи с этим исследование взаимодействия в ходе регуляции клеточного цикла между этиленом и NO, которое может быть связано с влиянием NO на синтез этилена, или с возможным вмешательством NO в работу белков, участвующих в передаче сигнала этилена представляет существенный научный интерес.

Цель и задачи исследования. Цель исследования состояла в изучении регуляции NO клеточного цикла в культивируемых клетках *Arabidopsis thaliana* в зависимости от функционирования пути передачи этиленового сигнала.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить динамику образования NO в культивируемых клетках *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и этилен-нечувствительного мутанта *ein2-1*.
2. Установить пределы допустимых концентраций донора NO нитропрусида натрия (SNP), обработка которым культивируемых клеток Col-0 и *ein2-1* ведёт к внутриклеточному накоплению NO, но не оказывает влияния на жизнеспособность клеток.
3. Исследовать влияние NO на синтез этилена культивируемыми клетками *A. thaliana* Col-0 и *ein2-1*.
4. Выявить влияние NO на прохождение клеточного цикла в культурах клеток *A. thaliana* Col-0 и *ein2-1*.
5. Проанализировать изменение фосфорилирования клеточных белков, выделенных из культивируемых клеток *A. thaliana* Col-0 и *ein2-1*, обработанных донором NO.
6. Выявить влияние NO-зависимых посттрансляционных модификаций на ферментативную активность МАРК *A. thaliana*, участвующих в регуляции синтеза этилена, NO и клеточного цикла.

Научная новизна. Настоящая работа, посвящённая изучению влияния NO и его производных на пролиферацию неподвергнутого стрессорному воздействию культивируемых клеток *A. thaliana*, является оригинальным научным исследованием. При изучении образования NO культивируемыми клетками *A. thaliana* впервые показано, что уровень и динамика накопления внутриклеточного NO зависят от сбалансированной работы пути передачи сигнала этилена. Впервые показано, что в культивируемых клетках этилен и NO ингибируют синтез друг друга. В культивируемых клетках этилен способствует эндоредупликации: он стимулирует

G1/S-переход, но ингибирует G2/M-переход. Снижение доли S-фазных клеток под действием NO связано с падением уровня этилена. Впервые показана регуляция NO ферментативной активности MAPK, участвующих в передаче сигнала этилена и регуляции клеточного цикла у растений. Эти новые данные указывают, что NO вмешивается в передачу сигнала этилена на уровне MAPK. Полученные в работе результаты указывают на общность молекулярных событий, происходящих в клетках всех эукариот в ответ на действие NO, а именно: значение NO не ограничивается лишь его ролью регулятора межклеточного сигналинга при стрессах. Напротив, NO – важный регуляторный компонент активно делящихся клеток.

Практическая значимость. Полученные в работе данные имеют, прежде всего, фундаментальный характер. Вместе с тем, они могут иметь и практическое значение ввиду того, что в клетках высших эукариот NO – патофизиологический регулятор клеточного цикла, старения и запрограммированной клеточной смерти. В связи с этим в настоящее время синтезируются новые доноры NO для их использования в терапии серьезных заболеваний человека, в том числе, онкологических. Для выяснения свойств вновь синтезируемых доноров NO необходимо применять неинвазивные способы оценки их биологической активности, исключающие использование изолированных органов и тканей. Полученные в настоящей работе данные указывают, что культивируемые клетки растений могут оказаться перспективными для рациональной биохимической манипуляции пролиферацией растительных клеток, а также при осуществлении доклинического тестирования новых фармакологических препаратов.

Материалы, изложенные в диссертации, также могут быть использованы в учебной работе при подготовке лекционного материала для чтения курсов лекций по физиологии и биохимии растений в высших учебных заведениях.

Степень достоверности работы. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе комплекса методических подходов. При выполнении работы применены современные адекватные и высокочувствительные методы исследования: молекулярно-биологические, цитологические, биохимические и физиологические. Эксперименты проведены в достаточной биологической повторности. Полученные в работе результаты оценены с использованием адекватных

методов статистической обработки данных. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах.

Апробация результатов. Полученные в работе данные доложены на VIII съезде Общества физиологов растений «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); XXII Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015» (Москва, 2015); Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, 2013); Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013); Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений», (Минск, 2013); XIX Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012).

Положения, выносимые на защиту.

1. Чувствительность к действию NO культивируемых клеток *A. thaliana* Col-0 и *ein2-1* зависит от функциональной активности белков, ответственных за передачу этиленового сигнала.
2. Клетки *A. thaliana* Col-0 активно синтезируют этилен и накапливают NO по мере роста числа клеток. Напротив, клетки этилен-нечувствительного мутанта *ein2-1* в момент выхода из лаг-фазы характеризуются повышенной продукцией NO, тогда как синтез этилена в них существенно снижен. То есть, в культивируемых клетках этилен и NO влияют на синтез друг друга.
3. Для регуляции клеточного цикла необходимы этилен и NO. В культуре клеток Col-0 и *ein2-1* под действием низких (до 100 мкМ) концентраций донора NO наблюдается тенденция к увеличению доли S-фазных клеток. При концентрациях донора выше 100 мкМ в культуре клеток Col-0 NO останавливает клеточный цикл на уровне G1/S-перехода, а в культуре *ein2-1* – на уровне G2/M-перехода.
4. Под действием NO в клетках Col-0 и *ein2-1* отличаются спектр и уровень фосфорилирования белков. Эти отличия могут быть ключом к пониманию разного физиологического действия NO на клетки Col-0 и *ein2-1*, у которых вследствие мутации в гене *EIN2* путь передачи этиленового сигнала не работает.

5. В присутствии донора NO в клетках Col-0 и *ein2-1* образуется пероксинитрит, способный модифицировать аминокислотные остатки Тир, что приводит к появлению в клетках нитрированных белков.
6. Нитрирование и S-нитрозилирование МАРК *A. thaliana*, участвующих в передаче этиленового сигнала (AtMPK3 и AtMPK6), регуляции деления клеток (AtMPK4) и синтеза этилена и NO (AtMPK6), влияет на их ферментативную активность.
7. В культивируемых клетках *A. thaliana* NO выполняет регуляторные функции, направленные на поддержание синтеза этилена на уровне, обеспечивающем активное деление клеток *in vitro*.

Связь с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнялась в 2012-2015 гг. в соответствии с планом научных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) по теме: «Изучение функций и взаимодействия протеинкиназ цианобактерии *Synechocystis* в условиях температурного стресса» (номер государственной регистрации 01200901964). Исследования автора как исполнителя поддержаны грантом РФФИ № 14-04-00333 «Необходимо ли функционирование пути передачи этиленового сигнала для реализации эффектов NO на пролиферацию клеток растений?». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из которых 6 – в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура диссертации. Диссертация состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследования, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Работа изложена на 179 страницах машинописного текста, включает 31 рисунок и 7 таблиц. Список литературы включает 260 наименований, из которых – 258 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объект исследования. В качестве объектов исследования использовали суспензионные культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia дикого типа (Col-0) и этилен-нечувствительного мутанта по гену *EIN2* (*ein2-1*).

Клетки выращивали в темноте, при 26°C, 70% влажности, при постоянном перемешивании, в стеклянных колбах в среде SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) с 3% сахарозы, 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л кинетина. Длительность пассажа составляла 10 суток.

Обработка суспензионных культур Col-0 и *ein2-1* донором NO. Клетки инкубировали на свету ($140 \text{ мкМ/м}^2 \times \text{сек}$) с донором NO нитропруссидом натрия (SNP) в концентрациях от 5 мкМ до 2 мМ. Все эксперименты проводили на четвёртые сутки после инокуляции клеток в свежую среду, когда клетки как Col-0, так и *ein2-1* находились в фазе активного деления.

Накопление активных форм азота (АФА) и АФК культивируемыми клетками Col-0 и *ein2-1* определяли при помощи флуоресцентных красителей. Для выявления NO применяли DAF-FM DA (4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеин диацетат, 5 мкМ), ONOO^- – APF (аминофенил флуоресцеин, 5 мкМ), АФК – DCFH-DA (дихлорофлуоресцеин диацетат, 1 мкМ), O_2^- – DHE (дигидроэтидиум, 10 мкМ). Флуоресценцию анализировали при помощи флуоресцентной микроскопии и/или Typhoon Trio+ Imager (GE Healthcare) при λ_{ex} 480 нм и λ_{em} BP 520 нм/40 нм для DAF-FM DA, DCFH-DA, APF и λ_{ex} 480 нм и λ_{em} BP 580 нм/30 нм для DHE.

Определение жизнеспособности культивируемых клеток производили при помощи 0,02% раствора Erythrosin B.

Определение доли клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, и оценка распределения ядер проводили по включению 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) в ДНК. За час до окончания инкубации с SNP добавляли EdU до концентрации 20 мкМ. Реакцию останавливали дезокситимидином (200 мкМ), после чего выделяли протопласты. Для детекции EdU, включившегося в ДНК, использовали набор Click-iT EdU Alexa Fluor 488 HCS (Invitrogen). ДНК окрашивали DAPI. Интенсивность флуоресценции оценивали при помощи проточного цитофлуориметра Gallios (Beckman Coulter). Для регистрации флуоресценции Alexa Fluor 488 использовали канал FL1 (λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 505-545 нм), DAPI – FL9 (λ_{ex} 405 нм, λ_{em} 430-470 нм). Данные анализировали в программе FlowJo 7.6.2 (<http://www.flowjo.com>).

Флуоресцентная микроскопия. Флуоресценцию регистрировали при помощи микроскопа Axio Imager Z2 (Zeiss) с цифровой камерой AxioCam MR и блоками фильтров. Фильтр № 44 (λ_{ex} BP 475 нм/40 нм; λ_{em} BP 530 нм/50 нм) использовали для

регистрации флуоресценции Alexa Fluor 488, DAF-FM DA, DCFH-DA, APF; фильтр № 02 (λ_{ex} G365 нм; λ_{em} LP420 нм) – для регистрации флуоресценции DAPI. Для регистрации флуоресценции витальных препаратов использовали модуль ApoTome (Zeiss). Изображения обрабатывали в программе AxioVision 4.8 (Zeiss).

Определение продукции этилена проводили в газовом хроматографе Цвет 106 с пламенно-ионизационным детектором и устройством для концентрирования углеводов (Ракитин, Ракитин, 1986).

ПЦР после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли из 100 мг растёртых в жидком азоте клеток при помощи Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma). Концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически при $\lambda=260$ нм (Spectrophotometer ND-1000 NanoDrop). Препараты РНК очищали от примеси ДНК при помощи ДНКазы I (Fermentas). Обратную транскрипцию проводили при помощи обратной транскриптазы SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР проводили в 20 мкл буфера, содержащего 60 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 25 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон X-100, 10 мМ β -меркаптоэтанол, по 0,2 мМ дНТФ, 3 ед. акт. Таq-полимеразы HotTaq (Fermentas), по 2 пмоль каждого из праймеров, 10-100 нг ДНК. Продукты реакции разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. В качестве гена сравнения использовали *EF1A*.

Выделение белков из культивируемых клеток Col-0 и *ein2-1*. Белки из растёртых в жидком азоте культивируемых клеток экстрагировали в течение 30 мин на льду в буфер, который содержал 50 мМ Трис-НСl (рН 8), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭДТА, 250 мМ сахарозы, 1 мМ бензамидина, 1 мМ ДТТ, 50 мМ β -глицерофосфата, 2 мМ Na₃VO₄, 10 мМ NaF, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ФМСФ. Полученный экстракт центрифугировали 30 минут при 16000 \times g, при 4°C. Полученный супернатант переводили в 10 мМ Трис-НСl буфер (рН 7,6) при помощи гель-фильтрации в колонке NAP-5 (GE Healthcare). Содержание белка определяли при помощи бичинхоинового реагента (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma).

Фосфорилирование цитозольных белков (16000 \times g) *in vitro* проводили в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ MnCl₂, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, 2 мМ Na₃VO₄, 10 мМ β -глицерофосфат, 1 мМ бензамидин, 10 мМ АТФ и по 37 кБк [γ -³²P]АТФ (уд. акт. 110 ТБк/ммоль) на

каждые 6 мкг белка. Реакцию инициировали добавлением к реакционной смеси белка, проводили в течение 20 мин при 30°C и останавливали добавлением ацетона до конечной концентрации 80%.

Для определения МАРК активности *in vitro* образцы (до 10 мкг белка) инкубировали 20 мин при 30°C в реакционной смеси (объёмом 25 мкл), содержащей 0,25 мг/мл МВР (Myelin basic protein), 20 mM Трис-НСl (рН 7,6), 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ, 1 mM ФМСФ, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM β-глицерофосфат, 1 mM бензамидин, 10 мкМ АТФ и 37 кБк [γ-³²P]АТФ (уд. акт. 110 ТБк/ммоль). Реакцию инициировали добавлением к реакционной смеси исследуемого белка, останавливали трёхкратным буфером образцов для ДДС-На-ПААГ электрофореза и кипячением. Затем проводили электрофорез в денатурирующих условиях в 15% ПААГ. Для визуализации фосфорилирования МВР окрашенные Кумасси СВВ R-250 гели высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой Kodak Biomax MR-1.

Электрофорез белков в денатурирующих условиях (ДДС-На-ПААГ) проводили в 12,5%, 13% и/или 15% ПААГ (Т=30%, С=2,67%) по Laemmli (1970).

Двумерный электрофорез (2-DE) белков. Препараты белков, выделенные из клеток Col-0 и *ein2-1*, инкубированных в течение шести часов с SNP, после реакции фосфорилирования *in vitro* разделяли при помощи двумерного электрофореза (2-DE). Белки, осаждённые ацетоном, собирали центрифугированием (16000×g, 20 мин при 4°C), очищали при помощи ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) и растворяли в буфере, содержащем 6 М мочевины, 1,5М тиомочевину, 3% CHAPS, 66 mM ДТТ, 0,5% биолитов рН 3/10 (Bio-Rad) и бромфеноловый синий. По 125 мкл растворённого белка наносили на поверхность 7-см полоски (стрип, Bio-Rad) с градиентом рН 4-7. Изоэлектрическое фокусирование производили в аппарате Protean IEF Cell (Bio-Rad). После изоэлектрофокусирования стрипы последовательно инкубировали (по 15 мин) в двух буферах. Первый буфер содержал 50 mM Трис-НСl (рН 8,8), 6 М мочевины, 30% глицерин, 2% ДДС-На, 10 мг/мл ДТТ. Второй буфер содержал 50 mM Трис-НСl (рН 8,8), 6 М мочевины, 30% глицерин, 2% ДДС-На, 25 мг/мл йодоацетамида. После этого располагали на поверхности 12,5% ПААГ и проводили ДДС-На-ПААГ. Вырезанные из 2-DE-гелей полипептиды, соответствующие фосфобелкам, идентифицировали при помощи MALDI-TOF MS в центре «Постгеномных и

нанотехнологических инноваций» на базе Инновационного центра медицинских нанобиотехнологий ГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА.

Полусухой перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra 0,45 мкм (GE Healthcare) проводили при помощи Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). После этого мембраны блокировали в TBST-буфере (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Твин 20) с 2% желатины (Cold Water Fish Skin Gelatin, Sigma), затем инкубировали с первыми антителами. В работе использовали первые моноклональные антитела мыши (Sigma) против дважды фосфорилированной формы МАРК ERK1/2, тирозинилированного тубулина, α -тубулина, 3-нитротирозина и фосфотирозина. Реакцию первых антител с белками выявляли при помощи антител кролика против антител мыши, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Promega). Комплексы антиген-антитело визуализировали при помощи Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad).

Получение и очистка рекомбинантных белков. Белкам *A. thaliana* AtMPK3, AtMPK4 и AtMPK6 соответствуют локусы AT3G45640, AT4G01370 и AT2G43790, а белкам AtMKK1 и AtMKK2 – AT4G26070 и AT4G29810. В качестве матрицы для амплификации кодирующих областей генов использовали кДНК, которую синтезировали в ходе обратной транскрипции. В реакционную смесь добавляли специфичные обратные праймеры для *AtMKK1/2* или олиго-dT₂₀ для *AtMPK3/4/5*. Для клонирования ПЦР-продуктов применяли вектор pET41a (Novagen). Для экспрессии рекомбинантных белков использовали клетки *E. coli* штамм Rosetta (DE3) pLysS. Бактериально экспрессированные белки очищали при помощи аффинной хроматографии на Bio-Scale™ Mini Profinity™ GST Cartridge (Bio-Rad). Соответствие очищенных рекомбинантных белков AtMPK3, AtMPK4, AtMPK6, AtMKK1 и AtMKK2 подтверждали при помощи MALDI-TOF MS.

Нитрирование рекомбинантных белков. Экспрессированные в бактериях очищенные при помощи аффинной хроматографии белки GST-AtMPK3/4/6 и GST-AtMKK1/2 инкубировали с 0,1-1 mM SIN-1 при 37°C в течение двух часов, после чего удаляли SIN-1 при помощи гель-фильтрации в колонке NAP-5 (GE Healthcare) и использовали для проведения реакций фосфорилирования *in vitro*.

S-нитрозилирование рекомбинантных белков. Очищенные при помощи аффинной хроматографии белки GST-AtMPK3/4/6 и GST-AtMKK1/2 инкубировали 30 мин при

25°C в 10 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,6) с добавлением 10 мМ ДТТ. Не прореагировавший ДТТ удаляли при помощи гель-фильтрации в колонке NAP-5. Затем белки инкубировали с 0,1-2,5 мМ GSNO (*S*-нитрозоглутатион) при 25°C в течение 30 мин, после чего удаляли GSNO при помощи гель-фильтрации в NAP-5 и использовали для проведения реакций фосфорилирования *in vitro*.

Окраска полиакриламидных гелей. После электрофоретического разделения белки в гелях окрашивали коллоидным Кумасси СВВ G-250 или Кумасси СВВ R-250.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили не менее чем в трёх биологических повторностях. На рисунках и в таблицах представлены среднеарифметические значения и их стандартные ошибки. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Влияние SNP на жизнеспособность, накопление NO и АФК культивируемыми клетками Col-0 и *ein2-1*. Известно, что эффект NO, как любого регулятора роста растений, зависит, в том числе, от использованной для обработки клеток концентрации. Мы установили, что на свету 24-час обработка клеток Col-0 донором NO (SNP) в концентрации до 50 мкМ не влияла на их сырую массу, при 500 мкМ SNP рост снижался на 15%, а при 2 мМ – на 25%. Изменение сырой массы клеток *ein2-1* при этих же концентрациях SNP не превышало 10% по сравнению с контролем. При этом культуры сохраняли жизнеспособность даже при действии 2-мМ SNP. При помощи спектрофлуориметрии показано, что обработка SNP клеток Col-0 и *ein2-1* уже через 3 час приводила к увеличению содержания NO в клетках обоих генотипов (рис. 1). Для доказательства специфичности использованного донора NO мы применили сквенджер NO 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (сРТЮ). В присутствии 100 мкМ сРТЮ флуоресценция DAF-FM значительно снижалась (рис. 1). То есть, обработка SNP, действительно, приводила к росту уровня внутриклеточного NO. При помощи флуоресцентной микроскопии в обработанных SNP клетках Col-0 и *ein2-1* мы наблюдали накопление NO в цитоплазме, ядре и отдельных органеллах (рис. 2),

которыми могут быть митохондрии или пероксисомы, как показано другими авторами (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012).

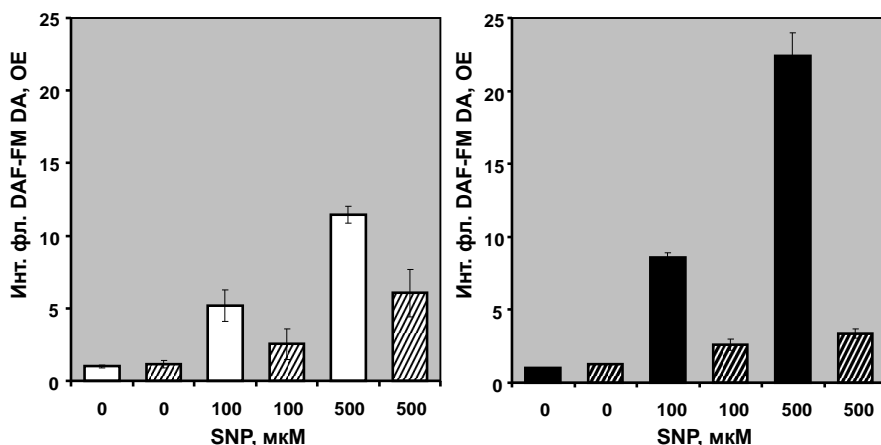


Рис. 1. Накопление NO в клетках Col-0 (слева) и *ein2-1* (справа) через 3 час инкубации с SNP. Пробы, в которые добавляли 100 мкМ сРТЮ, выделены штриховкой.

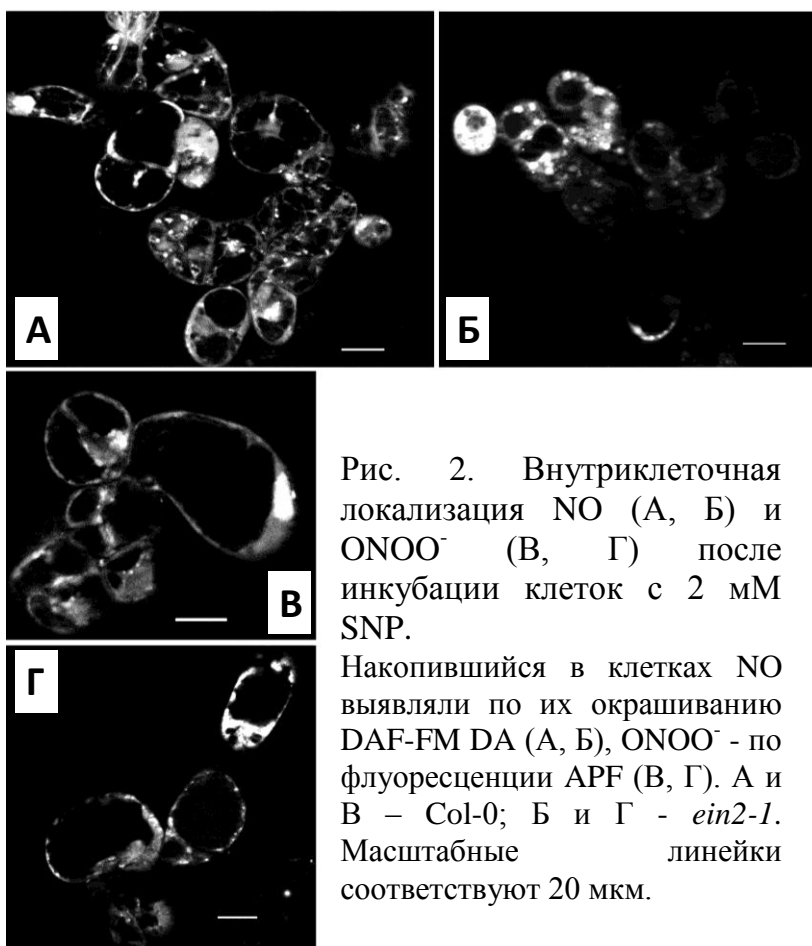


Рис. 2. Внутриклеточная локализация NO (А, Б) и ONOO⁻ (В, Г) после инкубации клеток с 2 мМ SNP.

Накопившийся в клетках NO выявляли по их окрашиванию DAF-FM DA (А, Б), ONOO⁻ - по флуоресценции APF (В, Г). А и В – Col-0; Б и Г - *ein2-1*. Масштабные линейки соответствуют 20 мкм.

Кроме того, обнаружено, что SNP снижал уровень АФК в клетках обоих генотипов, то есть окислительный взрыв не происходил. Такой результат можно объяснить тем, что NO способен регулировать «тонус» антиоксидантной защиты как на уровне транскрипции, так и на посттрансляционном уровне, влияя на активность белков антиоксидантной системы (Chaki *et al.*, 2009; Fares *et al.*, 2011; Lozano-Juste *et al.*, 2011). Отсутствие окислительного взрыва

указывает, что при выбранных концентрациях SNP клетки не подвергались действию стресса. Следовательно, их можно использовать для решения стоящих перед нами задач.

Накопление NO в клетках Col-0 и *ein2-1* в ходе периода субкультивирования. Нам удалось показать, что выход клеток из лаг-фазы в культуре Col-0 сопровождается синтезом этилена (рис. 3Д), тогда как в культуре *ein2-1* – NO (рис. 3Б).

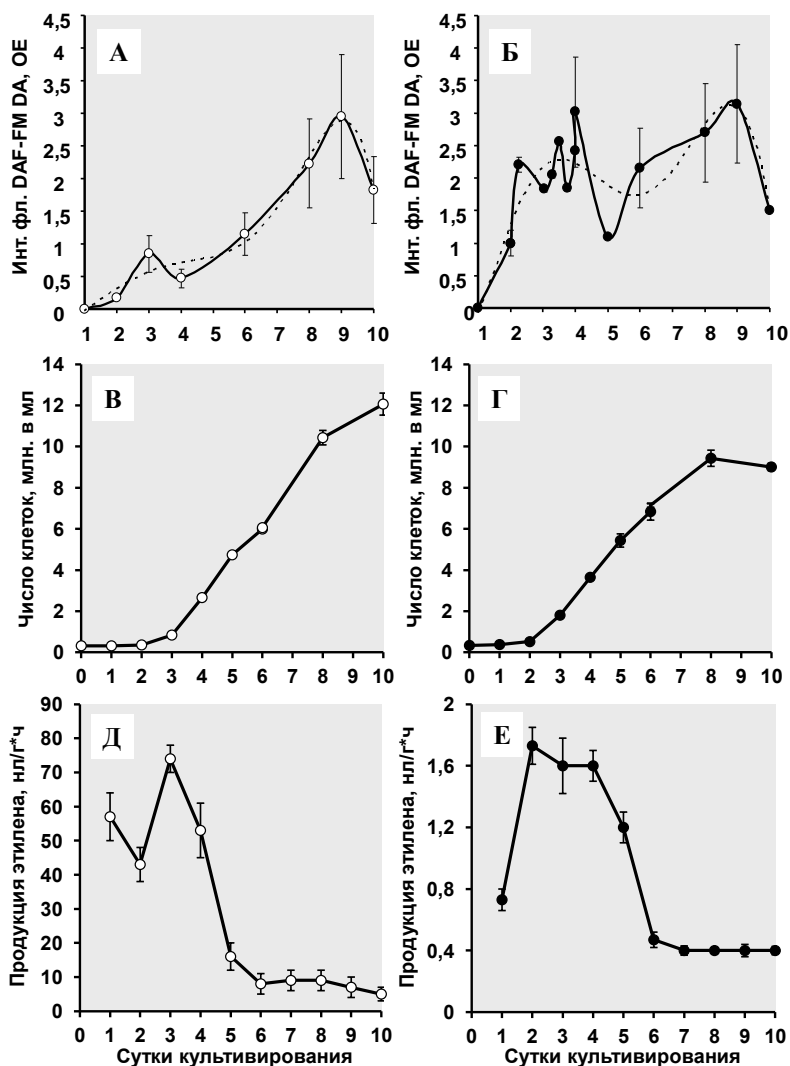


Рис. 3. Изменение накопления NO (А, Б), числа клеток (В, Г) и продукции этилена (Д, Е) в культурах клеток Col-0 (слева) и *ein2-1* (справа) в ходе периода субкультивирования.

Пунктиром (на А и Б) проведена линия тренда. ОЕ – относительные единицы.

Хотя в литературе имеются сведения о стимуляции NO выхода клеток из G0 (Correa-Aragunde *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2013), сложно сказать, являются в данной ситуации NO и этилен триггерами выхода клеток из G0, или увеличение концентрации

этих регуляторов – всего лишь следствие перехода клеток к активной пролиферации. Однако необходимость нормального функционирования белка EIN2 для регуляции синтеза как этилена, так и NO, является очевидной.

Влияние SNP на выделение этилена культивируемыми клетками Col-0 и *ein2-1*. О справедливости вывода об отсутствии при обработке SNP окислительного взрыва говорит и снижение продукции этилена клетками Col-0. Продукция этилена в необработанных клетках Col-0 составляла 54,6 нл/(г×час), 20-мкМ SNP снижал этот параметр до 46,3 нл/(г×час), 100-мкМ – до 27,8 нл/(г×час), а 500-мкМ – до 30,9 нл/(г×час). Мы не выявили такого эффекта в культуре *ein2-1*, что и не удивительно.

Действительно, на фоне высокого содержания в клетках *ein2-1* NO (рис. 3Б), продукция этилена этими клетками крайне мала и составляла 0,65 нл/(г×час). Эти данные говорят в пользу того, что в культивируемых клетках этилен и NO ингибируют синтез друг друга. Более того, можно предположить, что в регуляции клеточного цикла у растений этилен и NO способны действовать совместно.

Влияние NO на прохождение клеточного цикла культивируемыми клетками Col-0 и *ein2-1*. Чтобы убедиться в непротиворечивости высказанного предположения, мы изучили влияние обработки SNP на переход клеток к синтезу ДНК. У Col-0 через шесть часов обработки SNP в концентрациях 5 и 20 мкМ наблюдалась тенденция к увеличению количества S-фазных клеток (рис. 4). Увеличение концентрации донора до 100 и 500 мкМ значительно снижало долю S-фазных клеток (рис. 4). Донор NO в концентрации 5 мкМ увеличивал количество S-фазных клеток и в культуре *ein2-1* (рис. 4). Большие концентрации SNP (20, 100 и 500 мкМ) в культуре *ein2-1* не вызывали такого сильного падения числа S-фазных клеток, как в культуре Col-0.

По окрашиванию клеток Col-0 и *ein2-1* DAPI мы оценили их распределение по классам ploидности. В культуре Col-0 преобладали клетки с тетраплоидными (4C, 36%) и октаплоидными (8C, 38%) ядрами, но присутствовали также клетки и с бóльшей ploидностью (18%). Диплоидные (2C) клетки встречались редко: лишь 2% от общего их числа. Мы не выявили значительного влияния использованных концентраций SNP на спектр ploидности ядер в культуре клеток Col-0. Распределение по ploидности ядер клеток мутанта *ein2-1* сходно, но не идентично таковому в культуре клеток Col-0. Под действием SNP у *ein2-1* доля клеток, ядра которых содержали более 8C ДНК (16C и 32C), увеличивалась с 22% в необработанном SNP контроле до 31-33% после шести часов обработки 20-500 мкМ SNP. Снижение доли S-фаз в клетках Col-0 под действием 100 и 500 мкМ SNP сопровождалось падением уровня экспрессии *CYCD3;1*, тогда как экспрессия *CYCA2;3* и *CYCB1;1* не изменялась (рис. 5). В клетках *ein2-1* наблюдалось снижение экспрессии *CYCB1;1* под действием 500 мкМ SNP. Экспрессия *CYCA2;3* и *CYCD3;1* под действием SNP не изменялась (рис. 5).

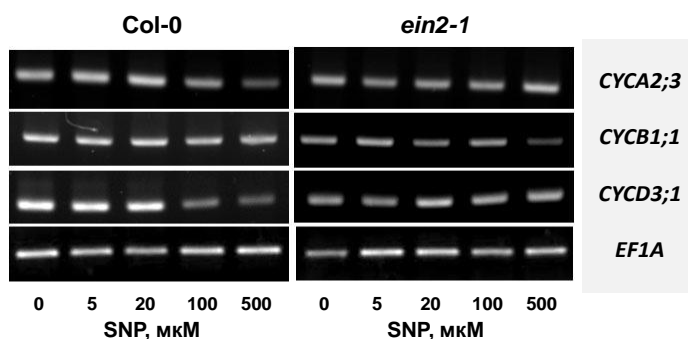
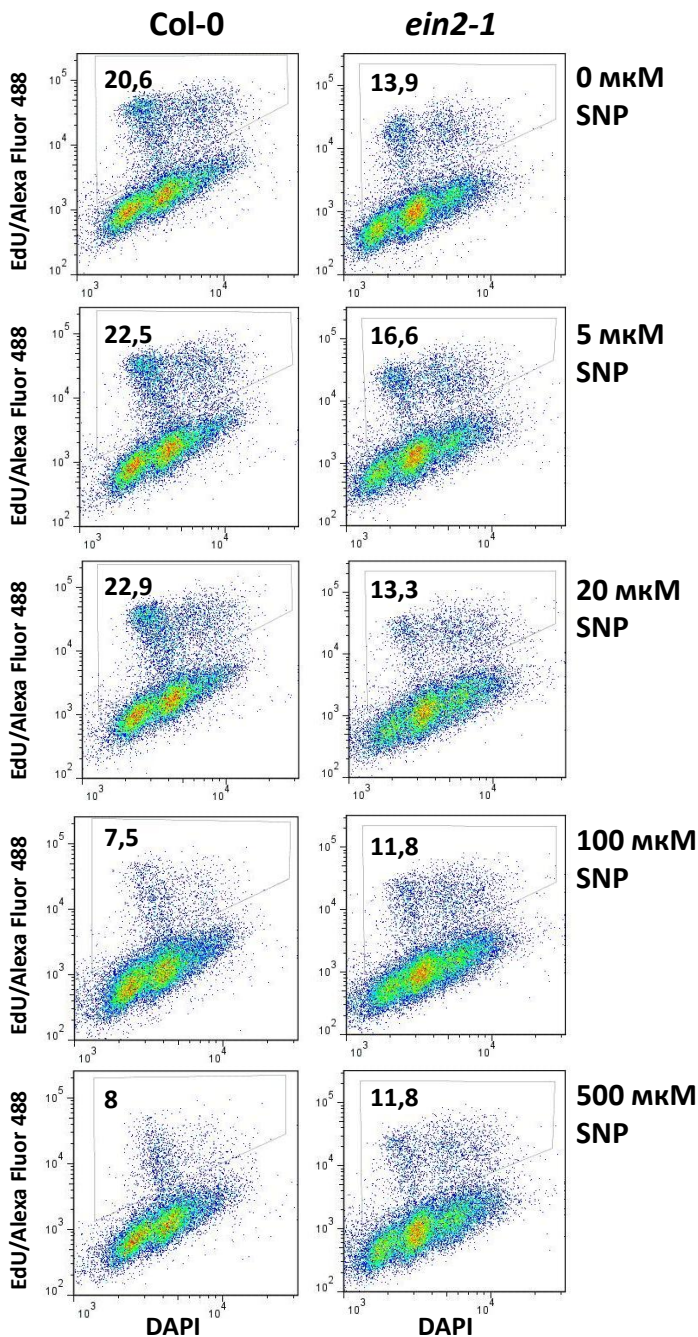


Рис. 5. Влияние шести часовой обработки SNP на экспрессию генов циклинов *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *CYCD3;1*. В качестве гена сравнения использовали *EF1A*.

Рис. 4. Бипараметрические диаграммы плотности распределения протопластов, выделенных из клеток Col-0 (слева) и *ein2-1* (справа), после шести часовой обработки клеток SNP.

На оси абсцисс - флуоресценция DAPI, соответствующая количеству ядерной ДНК, на оси ординат - флуоресценция Alexa Fluor 488, конъюгированного с EdU. Гейтами очерчены клетки, находящиеся в S-фазе. Цифрами внутри гейта обозначен процент S-фазных клеток от общего количества клеток. Справа приведены концентрации SNP, использованные для обработки клеток Col-0 и *ein2-1*.

Данные об изменении экспрессии генов циклинов также согласуются с результатам проточной цитофлуориметрии, а именно: отсутствие значительного влияния NO на G1/S-переход и остановку G2/M-перехода в культуре клеток *ein2-1*. Таким образом, мы показали, что обработка клеток Col-0 SNP в концентрации выше 100 мкМ нарушала G1/S-переход, тогда как эти же концентрации NO не препятствовали переходу клеток к синтезу ДНК в культуре *ein2-1*. Однако переход клеток *ein2-1* к

митозу нарушался (рис. 4, 5). Поскольку при концентрациях донора NO ниже 100 мкМ мы наблюдали стимуляцию синтеза ДНК как в клетках Col-0, так и *ein2-1* (рис. 4), то важный вывод, который можно сделать на основании этих данных, состоит в том, что чувствительность клеток к NO зависит от функционирования пути передачи этиленового сигнала.

Влияние SNP на фосфорилирование белков, выделенных из культивируемых клеток Col-0 и *ein2-1*. У интактных растений фосфорилирование белков – сигнальное событие, вовлечённое в передачу многих сигналов, в том числе, этилена. Мы задались вопросом, фосфорилирование каких белков меняется в результате EIN2-зависимой регуляции NO клеточного цикла. Среди белков, фосфорилирование которых изменялось в ответ на обработку NO, обнаружены ферменты первичного метаболизма и регуляторные белки (рис. б). Среди белков, фосфорилирование которых изменялось в ответ на обработку NO, обнаружены ферменты первичного метаболизма (пятна №2 – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, №4 – енолаза), а также регуляторные белки (пятна №3 – 14-3-3-подобный белок GF14 омега, протеин-дисульфидизомераза-подобный белок, №1 – шаперонин-60 альфа, №5 – HSP70-связывающий белок, №6 – NAP1-related protein).

Факт обнаружения NO-зависимого фосфорилирования белка 14-3-3 омега (пятно №3) представляет особый интерес, поскольку белки группы 14-3-3 могут регулировать клеточный цикл (Grønlund *et al.*, 2009), синтез этилена (Yoon, Kieber, 2013) и NO (MacKintosh, Meek, 2001), а также работу MAPK-модулей (Lalle *et al.*, 2005). Одно из возможных последствий обнаруженного фосфорилирования 14-3-3 могло выражаться в изменении сродства между фосфоформами 14-3-3 и их белкам-партнёрам и – как результат – изменению клеточного цикла, синтеза этилена, NO и активности MAPK. Крайне интересным представляет выявленное изменение под действием NO фосфорилирования цитозольной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPC, пятно №2). В клетках животных этот белок первичного метаболизма может подвергаться S-нитрозилированию, связываться с E3-убиквитин лигазой и после транслокации в ядро медиировать клеточную смерть (Hara *et al.*, 2006). У растений вопрос об ядерной транслокации GAPC нельзя назвать решённым.

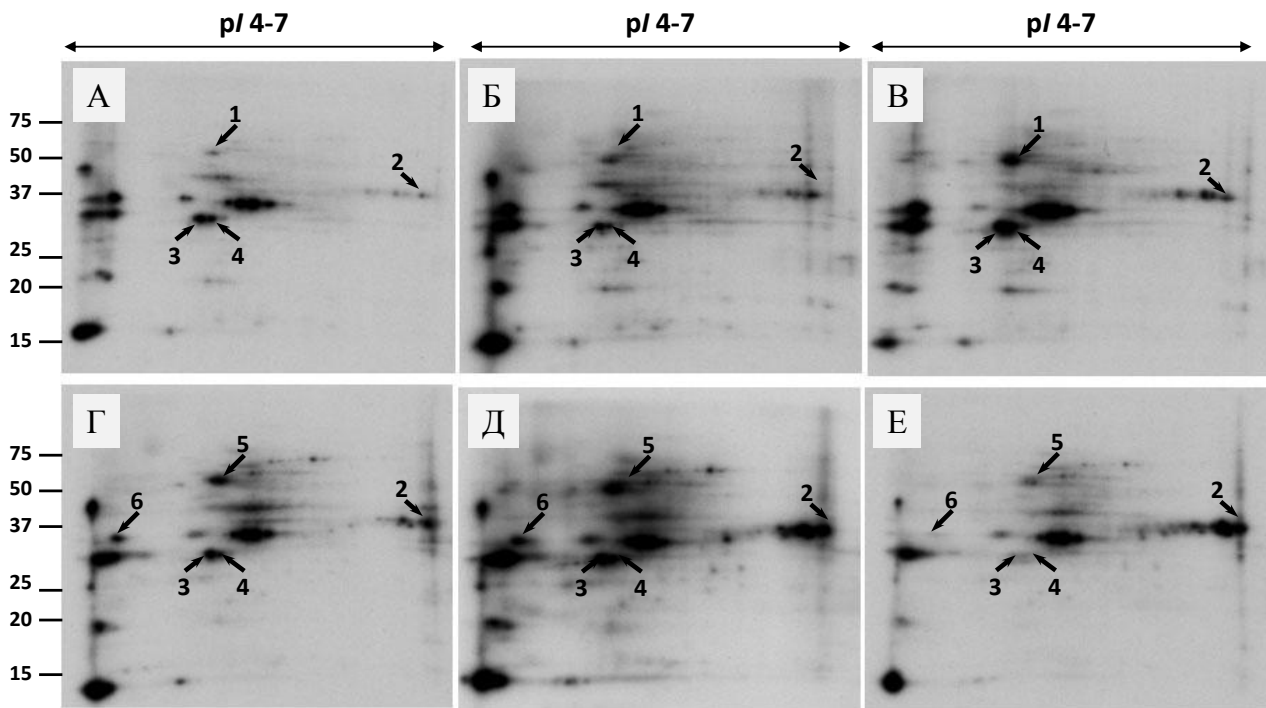


Рис. 6. Фосфорилирование *in vitro* фракции растворимых (16000×g) белков клеток Col-0 (А–В) и *ein2-1* (Г–Е) после обработки 100 мкМ (Б, Д) и 2мМ (В, Е) SNP в течение шести часов.

А, Г – необработанный SNP контроль. Стрелками отмечены полипептиды, идентифицированные при MALDI-TOF MS. Слева – величины мол. масс (кД) белковых маркеров, сверху – величина рН стрипов, использованных для изоэлектрофокусирования.

Показано, что в суспензионной культуре клеток *Nicotiana tabacum* при солевом стрессе росло S-нитрозилирование GAPC, а две изоформы GAPC взаимодействовали с протеинкиназой NtOSAK и в цитозоле, и в ядре (Wawer *et al.*, 2010). То есть, подобно клеткам животных, растительная GAPC проявляла свойства отличные от её привычных свойств фермента гликолиза. Транслокация GAPC в ядро показана и в корнях проростков *Arabidopsis* при стрессе, вызванном катионами Cd (Vescovi *et al.*, 2013), причём перемещение GAPC в ядро усиливалось, если в её молекуле аминокислотный остаток Цис заменяли на Сер. Иными словами, у *Arabidopsis* при Cd-стрессе S-нитрозилирование не имело отношения к перемещению GAPC в ядро. Работает ли GAPC у растений так, как показано Нага с соавт. (2006) в клетках животных, неясно. Однако исследования в этом направлении определённо заслуживают продолжения.

Влияние NO-зависимых посттрансляционных модификаций на энзиматическую активность рекомбинантных MAPKK и MAPK. На основании физических и химических свойств NO можно предположить, что у него нет

собственного белкового рецептора. Этот факт усложняет «расшифровку» пути передачи сигнала NO. Вместе с тем известно, что при биотическом стрессе происходят изменения активности MAPK (Meng, Zhang, 2013). Но в ответе на разные патогены участвует не только NO, но и этилен, салициловая и жасмоновая кислоты. По этой причине не всегда возможно заключить, что обнаруживаемые изменения активности MAPK связаны исключительно с работой NO.

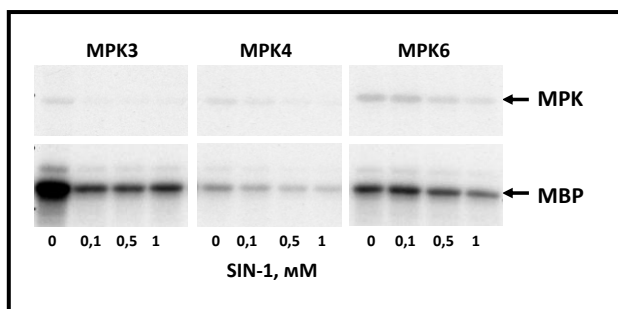


Рис. 7. Влияние нитрирования на автофосфорилирование и MBP-фосфорилирующую активность GST-AtMPK3 (MPK3), GST-AtMPK4 (MPK4) и GST-AtMPK6 (MPK6).

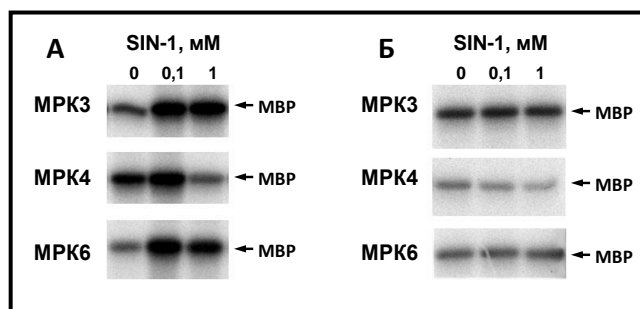


Рис. 8. Влияние нитрирования GST-AtMPK3/4/6 (А) и GST-AtMCKK1 (Б) на способность GST-AtMCKK1 активировать GST-AtMPK3 (MPK3), GST-AtMPK4 (MPK4) и GST-AtMPK6 (MPK6).

Могут ли MAPK отвечать за передачу сигнала NO? На примере объектов животного происхождения показано: да, могут (Bapat *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2006a; Narang *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2013). В литературе имеются данные о влиянии NO на активность MAPK ERK1/2, аналогами которых является 12 из 23 MAPK растений. Один из молекулярных механизмов действия NO – нитрирование и S-нитрозилирование белков. Мы выяснили, что нитрирование ингибирует автофосфорилирование и ферментативную активность AtMPK3/4/6 (рис. 7), но увеличивает их способность активироваться AtMCKK1 (рис. 8). То есть, нитрирование, скорее, происходит не в сайте фосфорилирования AtMPK3/4/6, поскольку не влияет на взаимодействие этих белков с антителами против фосфотирозина и дифосфорилированной формы MAPK (рис. 9). S-Нитрозилирование не изменяло активность GST-AtMAPK3/4/6 (рис. 10), тогда как ферментативная активность GST-AtMCKK1 существенно снижалась (рис. 11). Более того, S-нитрозилирование нарушало способность GST-AtMAPK4/6 активироваться GST-AtMCKK1 (рис. 11).

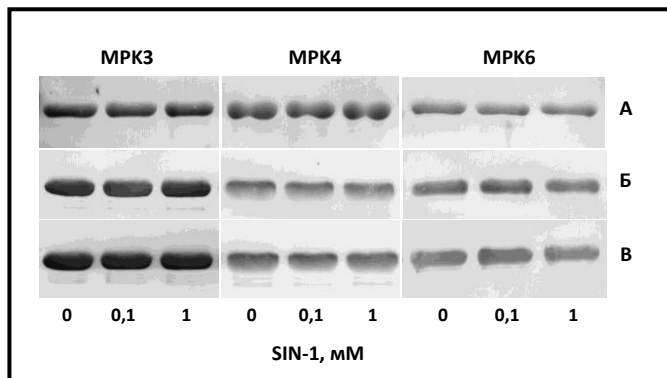


Рис. 9. Влияние обработки SIN-1 на нитрирование (А) и фосфорилирование (Б, В) GST-AtMPK3 (MPK3), GST-AtMPK4 (MPK4) и GST-AtMPK6 (MPK6).

В качестве первичных антител для вестерн-анализа использовали антитела против 3-нитротирозина (А), антитела против фосфотирозина (Б) и антитела против дифосфорилированной MAPK (В).

Таким образом, мы впервые показали NO-зависимые изменения как ферментативной активности белков AtMPK3/4/6, так и способности AtMCK1 фосфорилировать AtMPK3/4/6 *in vitro*. Хотя эти сведения относятся к рекомбинантным белкам AtMCK1 и AtMPK3/4/6, они показывают, во-первых, принципиальную возможность NO-зависимых посттрансляционных модификаций MAPK, которые вовлечены в передачу сигнала этилена (AtMPK3/6) и регуляцию

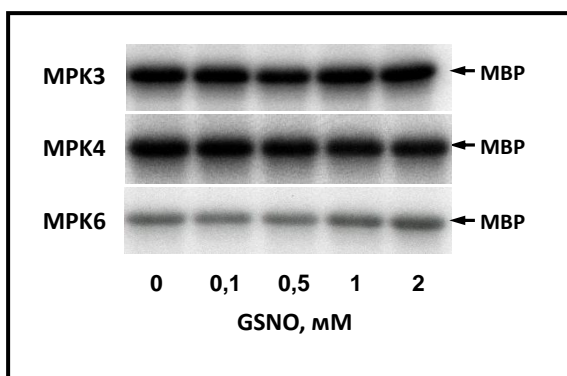


Рис. 10. Влияние S-нитрозилирования на ферментативную активность GST-AtMPK3/4/6 (MPK3/4/6) *in vitro*.

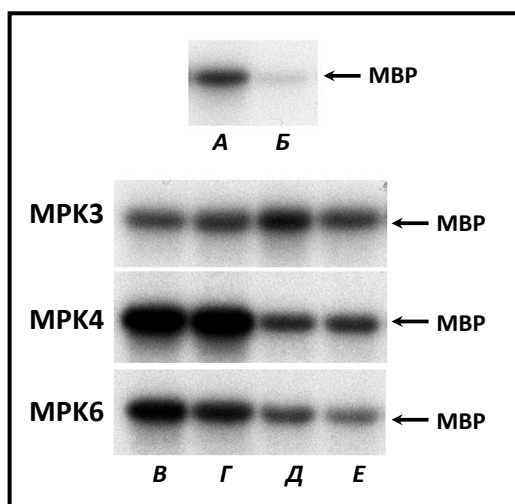


Рис. 11. Влияние GSNO (2,5 мМ) на MBP-фосфорилирующую активность GST-AtMCK1 и GST-AtMPK3/4/6 (MPK3/4/6).

Реакционная смесь содержала: GST-AtMCK1 (А); S-нитрозилированную GST-AtMCK1 (Б); GST-AtMPK3/4/6 и GST-AtMCK1 (В); GST-AtMPK3/4/6 и S-нитрозилированную GST-AtMCK1 (Г); S-нитрозилированную GST-AtMPK3/4/6 и GST-AtMCK1 (Д); S-нитрозилированную GST-AtMPK3/4/6 и S-нитрозилированную GST-AtMCK1 (Е).

клеточного цикла (AtMPK4). Во-вторых, указывают, что интервенция NO в передачу сигнала этилена может осуществляться на уровне MAPK.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В настоящее время сложилось представление, что этилен индуцирует эндоредупликацию (Gendreau *et al.*, 1999; Dan *et al.*, 2003). Эти представления не потеряли своей актуальности. Показано, что у *Arabidopsis* этилен стимулирует выход клеток корня из меристематической зоны. Так, ситуация в корнях проростков *ctr1* сходна с таковой в проростках дикого типа, обработанных этиленом, тогда как мутант *etr1* похож на дикий тип, но без обработки этиленом. Мутант *ein2* «проявил себя» неожиданно: у *ein2* эндоредупликация начиналась раньше, чем в необработанных, но позже, чем в обработанных этиленом клетках корней проростков дикого типа (Street *et al.*, 2015). Следовательно, у растений *ein2* работает какой-то «неучтённый» фактор, регулирующий эндоредупликацию. Мы предположили, что таким фактором может быть NO, накапливающийся в клетках *ein2-1* в отсутствие этилена (рис. 3Б).

Если AtMPK3/6, активность которых модулируется NO (рис. 7-11), фосфорилируют EIN3 (Yoo *et al.*, 2008), то NO в отсутствие этилена имитирует этиленовый сигнал. Так как у *ein2-1* накапливается много NO (рис. 1, 3), понятно, почему у этого мутанта по сравнению с Col-0 повышена экспрессия одного из генов ответа на этилен (*ERF1*) (Фоменков А.А., персональное сообщение), и идёт эндоредупликация (рис. 4, 5). Если объединить сведения литературы и наши наблюдения, то очевидно, что этилен нужен для индукции эндоциклов: он стимулирует G1/S-переход, но ингибирует G2/M-переход. Следовательно, в Col-0 снижение доли S-фазных клеток связано именно с падением под действием NO уровня этилена. Более того, в такой ситуации клетки Col-0 ведут себя как *ein2-1*, где много NO и мало этилена. Действительно, при обработке SNP у Col-0 S-фазных клеток становится столько же, сколько у *ein2-1* (рис. 4). Тогда в клетках *etr1* и NO, и этилена должно быть столько же, сколько у Col-0, а спектры плоидности *etr1* и Col-0 не должны отличаться, что и было показано Степанченко с соавт. (2012). Напротив, в клетках *ctr1* должно быть очень мало NO. Таким образом, за ингибирование синтеза NO должен отвечать именно белок EIN2. Отсюда становится понятно, почему у *etr1* число трахеальных элементов растёт и от этилена, и от MCP (Степанченко с соавт., 2012): MCP нарушает передачу сигнала этилена, поскольку необратимо связывается с его рецепторами, и вследствие этого растёт содержание NO, который запускает экспрессию *ERF1*. Становится также понятно, почему у Col-0 под действием 100 и

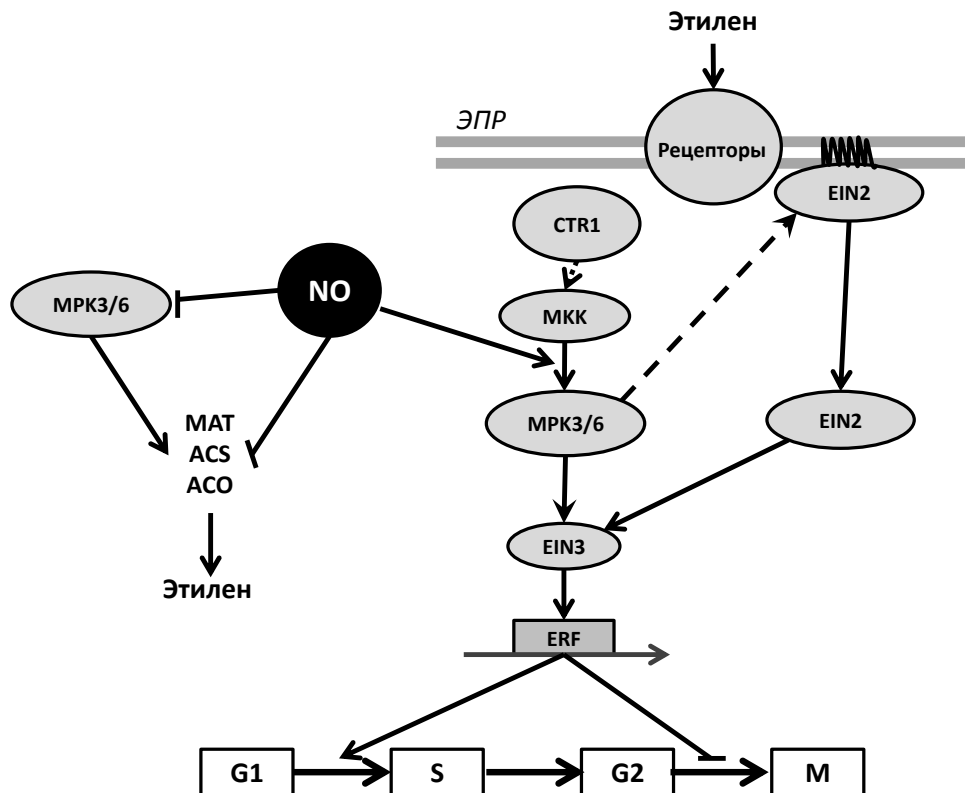


Рис. 12. Возможный механизм действия NO на клеточный цикл.

В присутствии этилена функционирует путь передачи этиленового сигнала, что приводит к эндоредупликации: ингибированию G2/M-перехода и возможной стимуляции G1/S-перехода. Вовлечённый в передачу этиленового сигнала MAPK-каскад включает MPK3/6, которые фосфорилируют EIN3. В результате такой активации EIN3 индуцирует экспрессию генов ответа на этилен (ERF). Под действием NO происходит нитрирование MPK3/6, что увеличивает их способность активироваться MKK, в результате чего можно наблюдать эффекты этилена на клеточный цикл (эндоредупликацию) даже в отсутствие этилена. С ростом концентрации NO может снижаться продукция этилена вследствие ингибирования NO работы ферментов биосинтеза этилена (MAT, ACS, ACO) путём NO-зависимых посттрансляционных модификаций либо снижения активности MPK3/6, которые в немодифицированном состоянии фосфорилируют ACS2/6, что ведёт к увеличению их стабильности.

500 мкМ SNP выделение этилена падает, но растёт экспрессия *ERF1* (Фоменков А.А., персональное сообщение). То есть, в клетках Col-0 в ответ на обработку SNP нарушается существующий баланс между NO и этиленом. Основываясь на полученных в работе данных, мы считаем, что NO и этилен являются сигналами, которые запускают в отсутствие стресса эндоредупликацию и переход к дифференцировке. Механизмы действия NO на клеточный цикл у растений,

выявленные в ходе работы и рассмотренные в контексте уже известных закономерностей регуляции клеточного цикла, схематически представлены на рис. 12.

Таким образом, значение NO не ограничивается лишь его ролью регулятора межклеточного сигналинга при стрессах. Напротив, NO – важный регуляторный компонент активно делящихся клеток.

ВЫВОДЫ

1. Чувствительность культивируемых клеток *A. thaliana* к действию оксида азота (NO) связана с функционированием пути передачи этиленового сигнала.

2. В культивируемых клетках *A. thaliana* этилен и оксид азота ингибируют синтез друг друга.

3. Под действием низких концентраций оксида азота в клетках *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и мутанта по позитивному регулятору пути передачи этиленового сигнала EIN2-1 наблюдается увеличение доли S-фазных клеток. Высокие концентрации оксида азота в клетках Col-0 останавливают G1/S-переход, тогда как в клетках *ein2-1* – G2/M-переход. То есть, и этилен, и NO необходимы для регуляции клеточного цикла в культивируемых клетках.

4. Дифференциальная регуляция NO фосфорилирования белков оксидом азота – необходимая составляющая механизма действия NO на клеточный цикл.

5. Оксид азота регулирует клеточный цикл путём интервенции в сигнальный путь этилена вследствие прямого влияния на активность MAPK3/6.

6. Оксид азота регулирует работу MAPK-модулей посредством нитрирования аминокислотных остатков тирозина, которые располагаются вне сайтов фосфорилирования AtMPK3, AtMPK4 и AtMPK6.

7. Совокупность полученных в работе данных указывает на общность молекулярных событий, происходящих в клетках всех эукариот в ответ на действие NO, а именно: значение NO не ограничивается лишь его ролью регулятора межклеточного сигналинга при стрессах. Напротив, NO является важным регуляторным компонентом активно делящихся клеток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ

1. Breygina M., Matveyeva N., Polevova S., Meychik N., Nikolaeva Y., **Мамаева А.**, Yermakov I. (2012) Ni²⁺ effects on *Nicotiana tabacum* L. pollen germination and pollen tube growth. *Biometals.*, **25**, 1221–1233.
2. Новикова Г.В., Носов А.В., Степанченко Н.С., Фоменков А.А., **Мамаева А.С.**, Мошков И.Е. (2013) Пролиферация клеток растений и её регуляторы. *Физиология растений*, **60**, 529–536.
3. Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., **Мамаева А.С.**, Новикова Г.В. (2014) Цитофизиологические особенности культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* с нарушенным восприятием сигнала этилена рецептором ETR1. *Физиология растений*, **61**, 640–650.
4. Носов А.В., Фоменков А.А., **Мамаева А.С.**, Соловченко А.Е., Новикова Г.В. (2014) Дополнительные возможности использования клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксинуридина с азидами флюорохромоов в изучении клеточного цикла и метаболизма дезоксирибонуклеозидов. *Физиология растений*, **61**, 893–904.
5. **Мамаева А.С.**, Фоменков А.А., Носов А.В., Мошков И.Е., Мур Л.А. Дж., Холл М.А., Новикова Г.В. (2015) Регуляторная роль оксида азота у растений. *Физиология растений*, **62**, 459–473.
6. Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., Суханова Е.С., **Мамаева А.С.**, Собољкова Г.И., Носов А.М., Новикова Г.В. (2015) Этилен сопровождает пролиферацию культивируемых клеток растений или участвует в ее регуляции? *Физиология растений*, **62**, 839–846.

Публикации в сборниках и материалах конференций

1. **Мамаева А.С.** (2012) Действие ионов никеля на прорастание пыльцы табака. Тезисы докладов XIX международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012», Москва, с. 237–238.
2. Фоменков А.А., Носов А.В., **Мамаева А.С.**, Новикова Г.В., Ракитин В.Ю., Мошков И.Е. (2013) Функционирование этиленового сигнального пути необходимо для активной пролиферации культивируемых клеток растений *in vitro*. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений», Минск, с. 82.

3. **Мамаева А.С.**, Фоменков А.А., Носов А.В., Новикова Г.В. (2013) Клеточный цикл – мишень действия NO? Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений», Москва, с. 147–148.
4. Новикова Г.В., **Мамаева А.С.**, Фоменков А.А., Носов А.В. (2013) Модификация NO белков высших растений в нормальных условиях и при стрессе. Тезисы докладов I Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений», Казань, с.46
5. **Мамаева А.С.** (2015) Этилен-зависимая регуляция клеточного цикла оксидом азота. Тезисы докладов XXII международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015», Москва.
6. **Мамаева А.С.**, Фоменков А.А., Носов А.В., Миронов К.С., Ракитин В.Ю., Новикова Г.В. (2015) Роль взаимодействия этилдена и NO в контроле пролиферации культивируемых клеток *Arabidopsis*. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, с. 331.
7. Фоменков А.А., Ракитин В.Ю., **Мамаева А.С.**, Новикова Г.В., Носов А.В. (2015) Гипоксия в культивируемых клетках *Arabidopsis thaliana* – этилен необходим. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, с. 555.